

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 05 JUL 2004

WIPO PCT

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:**

103 21 263.9

**Anmeldetag:**

09. Mai 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Novosom AG, 06120 Halle/DE

**Bezeichnung:**

Injizierbare liposomale Depots zum Peptid- &  
Proteindelivery

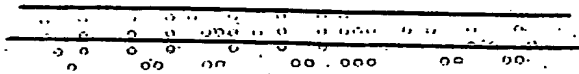
**IPC:**

A 61 K 9/127

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*[Signature]*  
Dzierzon



Deutsche Patentanmeldung

~~Belegexemplar~~

5

Injizierbare liposomale Depots zum Peptid- & Proteindelivery

10

15

20

25

30

35

Die Erfindung betrifft liposomale Formulierungen zur Herstellung eines injizierbaren Depots von Peptid- und Proteinwirkstoffen zur langanhaltenden Freisetzung und Wirkung in einem Säugerkörper.

## Stand der Technik

## Belegexemplar

Peptid- und Proteinwirkstoffe werden im Körper nach Applikation sehr schnell abgebaut oder ausgeschieden, und müssen daher durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Um die „patient compliance“ zu erhöhen wird ein geeignetes Deliverysystem benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam in die Blutbahn freigibt. Dazu werden Depotsysteme eingesetzt, die subkutan oder intramuskulär injiziert oder implantiert werden. Liposomen sind eine mögliche Form eines solchen Trägersystems. Sie sind aufgebaut aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten und umschließen in ihrem Innern ein wässriges Kompartiment, in welches wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können. In die Lipid-Doppelschicht können lipophile Substanzen eingebaut werden.

In J. Controll. Rel. 64 (2000) 155-166, in der US 5766627 und anderen Schriften der Autoren werden multivesikuläre Aggregate aus Liposomen als injizierbares Depotsystem für Insulin, Leuprolide und Enkephalin vorgestellt, die durch einen Doppelemulsionsprozess gewonnen werden. Wegen des Zusatzes unpolarer Triglyceride sind diese multizentrischen Aggregate nicht als Liposomen im engeren Sinne aufzufassen, da die Triglyceride keine Bilayermembranen bilden und nicht in solche eingebaut werden. Nachteilig ist weiterhin die Nutzung einer mit Wasser nicht mischbaren Ölphase zur Herstellung der Strukturen. Insbesondere beim Einschluss grösserer Proteine führt das zur Denaturierung an der Grenzfläche. Ebenso stellen Reste organischer Lösungsmittel ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar.

Für Depotsysteme finden nach dem Stand der Technik Liposomen Verwendung, die aus neutralen, anionischen oder PEG-Lipiden zusammengesetzt sind, etwa in der WO 9920301 für ein Depot von  $\gamma$ -Interferon, in Diabetes 31 (1982), 506-511 für ein Depot von Insulin; weiterhin in Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) zur Vakzinierung.

In BBA 1328 (1997), 261-272 werden verschiedene liposomale Systeme (unilamellar und multilamellar) aus Ei-PC, Ei-PG, DPPC, DPPG, PS und Cholesterin auf deren Aufnahme ins Lymphsystem und der Bioverteilung

nach subkutaner Gabe hin untersucht. Der Review-Artikel Advanced Drug Delivery Reviews 50 (2001), 143-156 schliesst an diese Untersuchungen an. Hier wird gezeigt, dass kleinere Liposomen (<150nm) aus einem subkutanen Depot in die Lymphe auswandern.

Nach dem Stand der Technik werden also neutrale und negativ geladene Liposomen für liposomale Depotsysteme verwendet. Die Liposomen müssen eine Mindestgrösse aufweisen, um nicht in die Lymphe abzuwandern.

Die Herstellung grosser Liposomen von deutlich mehr als 150nm ist aber mit technischen und regulatorischen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere ist dann die wünschenswerte Sterilfiltration der Partikel nach deren Herstellung nicht mehr möglich.

Aufgabe der Erfindung war es nun, neue stabile liposomale Depotformulierungen bereitzustellen, die eine langfristige Freisetzung des Wirkstoffes über mindestens eine Woche erreichen, keinen oder nur vernachlässigbaren „burst release“ zeigen und eine gute Verträglichkeit im Organismus aufweisen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die Aufgabe wird gelöst durch die Formulierung der Wirkstoffe in Liposomen, die insbesondere bei der Anwendung als Depot in Form von Aggregaten vorliegen. Solche Liposomen umfassen in einer Ausführung der Erfindung neben neutralen Lipiden auch kationische Lipide.

Die Erfindung basiert auf der Beobachtung, dass positiv geladene Liposomen gut mit Komponenten des Serums oder der Interstitialflüssigkeit aggregieren und in diesem Zustand an der subkutanen oder intramuskulären Einstichstelle verbleiben müssen. Ein Wegdiffundieren des Depots von der Einstichstelle wird damit vermieden.

**Belegexemplar****Ausführliche Beschreibung der Erfindung**

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung werden  
5 Liposomen, die aus neutralen und kationischen Lipiden aufgebaut  
sind, als liposomales Depotsystem für die verzögerte Freisetzung von  
therapeutischen Peptiden und Proteinen eingesetzt. Da therapeutische  
Peptide und Proteine im Körper sehr schnell abgebaut werden, müssen  
diese durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Die für  
10 diese Ausführung der Erfindung relevanten Peptide und Proteine,  
deren Analoga, zugehörige Peptide, Fragmente, Inhibitoren und  
Antagonisten, sind z.B.: Transforming growth factors (TGF-alpha,  
TGF-beta), Interleukine (IL-1, IL-2, IL-3), Interferone (IFN-alpha,  
IFN-beta, IFN-gamma), Calcitonine, Insulin-like growth factors (IGF-  
15 1, IGF-2), Parathyroid hormone, Granulozyten-Makrophagen  
stimulierender Faktor (GM-CSF), Makrophagen stimulierender Faktor  
(M-CSF), Erythropoetin, Insuline, Amyline, Glucagone, Lipocortine,  
Wachstumshormone, Somatostatin, Gonadotropin releasing hormone  
(GnRH), Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), Platelet-  
20 derived growth factor; Thromboplastin-Aktivatoren, Gewebe  
Plasminogen Aktivatoren, Streptokinase, Vasopressin,  
Muramyl dipeptide (MDP), Atrial natriuretic factor (ANF), Calcitonin  
gene-related Peptide (CGRP), Bombesin, Enkephaline, Vasoaktives  
intestinales Peptide (VIP), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast  
25 growth factor (FGF), Growth hormone releasing hormone (GRH), Peptide  
T und Peptide T Amide, Herpes Virus Inhibitor, Virus Replikations  
Inhibitions Faktor, lösliches CD4, ACTH und Fragmente, Angiotensine,  
und ACE Inhibitoren, Bradykinin (BK), Hypercalcemia malignancy  
factor (PTH like adenylate cyclase-stimulating protein), beta-  
30 casomorphins, chemotactic peptides and inhibitors, corticotropin  
releasing factor (CRF), caerulein, cholecystokinins + Fragmente und  
Analoga, Galanin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), gastrins,  
gastrin releasing peptide (GRP), motilin, PHI peptides, PHM  
peptides, peptide YY, secretins, melanocyte stimulating hormone  
35 (MSH), neuropeptide Y (NPY), neuromedins, neuropeptide K,  
neurotensins, phosphate acceptor peptide (c-AMP protein kinase  
substrates), Oxytocine, substance P, TRH - sowie Fragmente, Analoga  
und Derivate dieser Stoffe.

Für die Herstellung der Liposomen werden nach dem Stand der Technik etablierte Verfahren, wie Extrusion durch Polycarbonat-Membranen, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation verwendet.

Als Lipide kommen membranbildende und membranständige Lipide in Frage, wobei diese natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Hierzu zählen insbesondere Cholesterin und Derivate, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine als neutrale Lipide. Besonders bevorzugt werden die vollständig gesättigten Verbindungen dieser Klasse verwendet, also beispielsweise Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Distearoylphosphatidylcholin.

Kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen beispielsweise:

DAC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

DC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

TC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol

BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,

DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid

DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid)

DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)

(Lipofectin®)

DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)

DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester)

DOGSOSO (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinyl-2hydroxyethyl disulfide ornithin),

DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid

DOGS ((C18)<sub>2</sub>GlySper3<sup>+</sup>) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin (Transfectam®).

(C18)<sub>2</sub>Gly<sup>+</sup> N,N-dioctadecylamido-glycin

DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin oder andere O-

Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,

**Belegexemplar**

Bevorzugte kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen Cholesteryl 3 $\beta$ -N-(Dimethyl-aminoethyl)carbamat (DC-Chol), DAC-Chol, (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium.Salz (DOTAP).

5 In einer bevorzugten Zusammensetzung werden gesättigte synthetische Phosphatidylcholine, wie DMPC, DPPC oder DSPC, Cholesterin, die kationischen Lipide DC-Chol, DAC-Chol oder DOTAP verwendet, wobei ganz besonders bevorzugt der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide  
10 zwischen 35 und 50% beträgt.

Die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, bevorzugt von 50-800 nm und ganz besonders bevorzugt von 150-300 nm.

15 Für den Einschluss des gewünschten Wirkstoffes in die Liposomen wird dieser in einer Pufferlösung gelöst, mit welcher dann die Liposomen hergestellt werden. Um hohe Einschlußraten zu erzielen, wird in einem bevorzugten Verfahren der Erfindung bei einem pH-Wert gearbeitet, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem  
20 anionischen Ladungszustand vorliegt. Für viele Proteine oder Peptide ist das unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei einem pH-wert zwischen 7 und 8 der Fall. Die Ladung der Wirkstoffe bei einem gegebenen pH kann aus Datenbanken entnommen werden, etwa der SWISS-PROT oder lässt sich nach bekannten Algorithmen berechnen.

25 Bei diesem Verfahren werden die Liposomen bei niedrigen Ionenstärken hergestellt, um eine maximale Wechselwirkung des Wirkstoffes an die membranbildenden Substanzen zu erreichen.

Nach der Liposomenpräparation wird nicht eingeschlossener Wirkstoff  
30 von der Oberfläche der Liposomen entfernt. Das geschieht durch eine Auflösung der bestehenden Wechselwirkung (z.B. Änderung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke). Der freie Wirkstoff kann mittels eines geeigneten Trennverfahrens abgetrennt werden. Hierfür können chromatographische Verfahren, Zentrifugation, Dialyse oder  
35 Ultrafiltration verwendet werden. Diese Abtrennung ist wesentlich für die Minimierung eines „burst release“, die Erfindung wird bevorzugt unter Einbeziehung dieses Schrittes ausgeführt.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden pH-

sensitiv kationische Lipide eingesetzt, wie sie in WO 02 066490 und US 5965434 beispielhaft offenbart sind. Solche Liposomen können durch pH-Wechsel in einen anderen Ladungszustand gebracht werden und ermöglichen so die einfache Abtrennung von aussen anhaftendem Wirkstoff. Beispiele für pH-sensitiv kationische Verbindungen sind:

His-Chol Histaminyll-Cholesterolhemisuccinat,  
Mo-Chol Morpholin-N-ethylamino-cholesterolhemisuccinat.

10

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.



## Beispiele

## Belegexemplar

## Beispiel 1

## 5. Einschluss von Insulin in Liposomen

Ein Gemisch aus 60 mol% DPPC, 10 mol% DC-Chol und 30 mol% Chol wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im

Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm

10. wird mit soviel human-Insulin-Lösung (rekombinantes Insulin) (4 mg/ml Insulin in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Rotieren hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die

15. Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert

20. (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die erhaltene Suspension durch Zugabe einer Stammlösung Glycin-HCl, pH=3,5 und NaCl

umgepuffert. Nach einer Filtration der Liposomen durch 0,8 µm erfolgt die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen Insulins über eine Gelfiltration (S-200-Säule, Pharmacia). Durch Zugabe einer HEPES-

Stammlösung, pH=7,5 wird wieder ein physiologischer pH eingestellt. Die Menge des eingeschlossenen Insulins wird nach der Freisetzung aus den Liposomen mittels eines ELISA (DRG-ELISA-Kit) bestimmt. Es ergeben sich Einschlussquoten von 50-60 % Insulin.

## Beispiel 2

## Einschluss von Inulin in Liposomen

Belegexemplar

Ein Gemisch aus 60 mol% DPPC, 10 mol% DC-Chol und 30 mol% Chol wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel 3H-Inulin-Lösung (18,5 MBq/ml 3H-Inulin in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) versetzt, dass eine 100mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Rotieren hydratisiert. Danach wird die Suspension eingefroren.

Nach dem Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 50, 200 oder 400 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 50 nm, 200 nm oder 400 nm). Die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen 3H-Inulins erfolgt über eine Gelfiltration (G75-Säule, Pharmacia). Die Menge des eingeschlossenen 3H-Inulins wird nach der Abtrennung im Scintillationszähler bestimmt. Es ergeben sich Einschlussquoten von 20-30 % 3H-Inulin.

## Beispiel 3

## Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell

Positiv geladene Liposomen nach Beispiel 2 wurden in einer Konzentration von 12,5 mM Lipid in einem Volumen von 0,5mL subkutan in gesunde Ratten injiziert. Eine Kontrollprobe mit Leerliposomen und 3H-Inulin wurde ebenfalls in einem Volumen von 0,5 mL subkutan verabreicht. Die pharmakokinetischen Daten wurden durch Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließende Scintillationsmessungen bestimmt. Die gesamte Versuchsdauer der Tierstudie betrug 2 Wochen. Nur bei zwei Formulierungen zeigten die Tiere laut Befundung leichte, lokale adverse Reaktionen (Rötungen an der Injektionsstelle), die aber nach spätestens 10 Tagen abgeheilt waren. Das Allgemeinbefinden aller Tiere war über die Versuchsdauer gut. Die Formulierungen und die relativen Bioverfügbarkeiten bis  $t=336$  h sind in folgender Tabelle dargestellt:

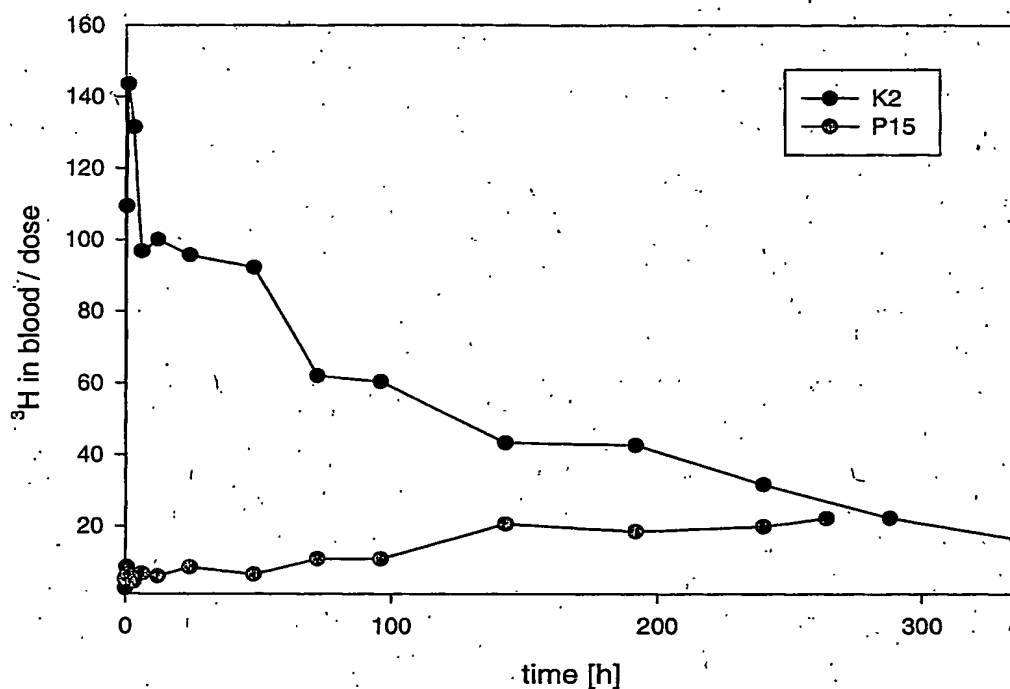
**Belegexemplar**

Formulierung	Zusammensetzung	Relative Bioverfügbarkeit bis t=336 h [%]
K 2	DPPE/DPPG/Chol 50:10:40 (200 nm) + 3H-Inulin aussen	100
P15	DPPE/DC-Chol/Chol 60:10:30 (200 nm)	23,6

## Belegexemplar

Abbildung 1

Vergleich der liposomalen Depotsysteme der vorliegenden Erfindung  
5 mit der injizierten Kontrollprobe im Tiermodell



## Patentansprüche

## Belegexemplar

1. Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung, dadurch gekennzeichnet, dass es Liposomen enthaltend neutrale und kationische Lipide, sowie einen Wirkstoff umfasst.
2. Abgabesystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen pH-sensitiv kationische Lipide umfassen.
3. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein therapeutisches Peptid oder Protein umfasst.
4. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% sich außerhalb des Liposoms befindet.
5. Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgabe des Wirkstoffes mindestens 1 Woche anhält.
6. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen
  - aus gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen, ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC und/oder DSPC,
  - aus Cholesterol,
  - die kationischen Lipide ausgewählt aus der Gruppe DC-Chol, DAC-Chol und/oder DOTAPzusammengesetzt sind.
7. Abgabesystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die kationischen Lipide pH-sensitiv kationisch sind und ausgewählt aus der Gruppe His-Chol und/oder Mo-Chol.

8. Abgabesystem nach den vorgehenden Ansprüchen 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 50% beträgt.
9. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, insbesondere von 50-800 nm, bevorzugt von 150-300 nm.
10. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Depots aus kationischen Lipiden dadurch gekennzeichnet, dass
- Liposomen in Gegenwart von Wirkstoff hergestellt werden, wobei bei einem pH-Wert gearbeitet wird, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem anionischen Ladungszustand vorliegt,
  - nichteingeschlossener, überschüssiger Wirkstoff von den Liposomen abgetrennt wird.
11. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels.
12. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur subkutanen oder intramuskulären Applikation.

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**